



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

LAURA VIDOTO PALUDETTO

**Sistemas inteligentes de liberação de biomoléculas
interferindo no reparo peri-implantar de ratas
osteoporóticas**

**Araçatuba – SP
2024**

LAURA VIDOTO PALUDETTO

**Sistemas inteligentes de liberação de biomoléculas
interferindo no reparo peri-implantar de ratas
osteoporóticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Roberta Okamoto

Coorientador: Dr. Fábio Roberto de Souza Batista

**Araçatuba – SP
2024**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P184s Paludetto, Laura Vidoto.
Sistemas inteligentes de liberação de biomoléculas
interferindo no reparo peri-implantar de ratas osteopo-
róticas / Laura Vidoto Paludetto. - Araçatuba, 2024
73f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Fábio Roberto de Souza Batista

1. Osteoporose 2. Implantes dentários 3.
Teriparatida 4. Ácido zoledrônico I. T.

Black D7
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

A **minha família**, que nunca mediu esforços para me deixar a herança mais valiosa que um ser humano pode ter: a educação.

Agradecimentos

Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, **Professora Assoc. Roberta Okamoto**, por ter sido muito mais que uma orientadora durante a pós-graduação: por ter sido uma inspiração e porto seguro. Agradeço por todo o carinho, paciência, preocupação, pelas oportunidades a mim ofertadas e pela confiança em meu trabalho. Trabalhar no LSMT, aprender e conviver com a senhora despertou em mim o desejo e amor pela carreira acadêmica e pela docência. Só tenho a agradecer por tudo e desejar que nosso tempo juntas esteja apenas começando.

Ao **Dr. Fábio Roberto de Souza Batista**, meu co-orientador, pela disponibilidade, ideias, conhecimentos transmitidos e conselhos dados. Você foi essencial para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus familiares, pelo incentivo, torcida e apoio irrestritos. Eu não teria conseguido chegar até aqui sem vocês. Obrigada, **pai, Fernando, mãe, Sônia e irmãos, Tiago e Mateus**. Amo muito vocês!

Ao meu companheiro, **João Victor**, pelo carinho e parceria durante esses dois anos, em todos os momentos. Tenho sorte de ter alguém tão especial como você em minha vida. Amo muito você!

As minhas amigas **Susan Sasaki, Bianca Longo Polo, Letycia Nayara Marton e Adriely Rebecchi Ferreira**, por se fazerem presentes na minha vida. mesmo que de longe, durante a pós-graduação;

Aos amigos de Pós-Graduação do LSMT, por terem me acolhido tão bem no grupo de pesquisa, pela amizade que construímos e pelo auxílio em todas as etapas do desenvolvimento deste estudo. **Ana Cláudia Ervolino da Silva, Letícia Pitol Palin, Naara Gabriela Monteiro, Paula Buzo Frigério, Juliana de Moura, Isadora Breseguello, Nathália Dantas Duarte e Tatiany Aparecida de Castro**: esse trabalho é de vocês também.

Aos alunos de Iniciação Científica do LSMT, especialmente a **Joyce Sayuri Akazaki**, meu braço direito nesse estudo: obrigada por tudo!

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, e em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba;

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo financiamento deste estudo;

Ao Laboratório Multiusuário da FOA-UNESP, pela disponibilização do microtomógrafo SkyScan 1272;

A FINEP (FINEP/CT-INFRA - Convênio FINEP: 01.12.0530.00 – PROINFRA 01/2011);

Aos professores, amigos e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela convivência, auxílio e amizade que construímos.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, por todos os ensinamentos e paciência. Admiro cada um de vocês.

Aos amigos de pós-graduação das áreas de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pelos momentos juntos compartilhados, histórias e pela amizade.

Epígrafe

*“ Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade. ”*

Raul Seixas

Resumo

PALUDETTO, L. V. **Sistemas inteligentes de liberação de biomoléculas inferindo no reparo peri-implantar de ratas osteoporóticas.** 2024. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

A menopausa traz consigo diversas alterações metabólicas e predispõe a mulher a algumas doenças relacionadas a essa alteração do metabolismo, dentre elas, à osteoporose. Dentre as possibilidades atuais de tratamento para tal condição existem os bisfosfonatos orais (fármacos anti-remodelação óssea), como o ácido zoledrônico. Entretanto, a administração sistêmica de tais medicações está relacionada a vários efeitos adversos a longo prazo e, por esse motivo, faz-se necessário estudar possibilidades locais para a melhoria do tecido ósseo comprometido. A proposta deste estudo foi avaliar e caracterizar o reparo ósseo peri-implantar em ratas osteoporóticas frente a utilização de implantes funcionalizados com algumas combinações de fármacos que possuirão efeitos locais sobre o processo de reparo. Para tal, primeiramente foi realizada a funcionalização dos implantes de titânio com ácido zoledrônico, ácido zoledrônico + teriparatida ou ácido zoledrônico + ruterpy pela técnica de Dip-coating e, posteriormente, com o objetivo de caracterizar o impacto de tais superfícies sobre o reparo peri-implantar, os procedimentos in vivo foram efetuados. Assim, 44 ratas foram divididas em 4 grupos conforme o tipo de tratamento de superfície dos implantes a serem instalados em suas metáfises tibiais: CONV (implantes sem funcionalização de superfície), ZOL (implantes funcionalizados com ácido zoledrônico pela técnica de Dip-coating), ZOL + TERI (implantes funcionalizados com ácido zoledrônico + teriparatida pela técnica de Dip-coating) e ZOL + TERPY (implantes funcionalizados com ácido zoledrônico + ruterpy pela técnica de Dip-coating). Os grupos foram submetidos a cirurgia de ovariectomia bilateral e tiveram os implantes instalados após 3 meses da mesma, de modo à indução da osteoporose. Cada animal recebeu dois implantes, sendo um em cada metáfise tibial, bilateralmente. A eutanásia ocorreu 28 dias após a instalação dos implantes. Foram realizadas as análises de microtomografia tridimensional (Micro-CT) e histológica qualitativa. Os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade seguido do teste Anova One-Way e do pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%. Houve diferença estatística significativa entre o grupo OVX CONV e os grupos OVX

ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY nos parâmetros de volume ósseo (BV.TV), número de trabéculas ósseas (Tb.N), separação entre as trabéculas ósseas (Tb.S), porosidade total do tecido ósseo (Po.tot) e interface de contato entre osso e implante (I.S); entre os grupos OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY, por outro lado, não houve diferença estatística em nenhum dos parâmetros analisados, entretanto resultados ligeiramente melhores foram encontrados no grupo OVX ZOL + TERI. Histologicamente os grupos OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY demonstraram maior neoformação de tecido ósseo na região peri-implantar quando comparados aos grupos OVX CONV e OVX ZOL, também com melhores resultados para OVX ZOL + TERI. Portanto, todos os grupos com funcionalização de superfície obtiveram desempenho superior ao grupo controle, com prováveis melhores resultados para OVX ZOL + TERI. Porém, são necessárias mais análises para confirmação de tal achado e investigação da consolidação da formação óssea a longo prazo.

Palavras-chave: Osteoporose. Implantes Dentários. Teriparatida. Ácido Zoledrônico. Ruterpy.

Abstract

PALUDETTO, L. V. **Smart delivery of biomolecules interfering with peri-implant repair in osteoporotic rats**. 2024. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Menopause brings with it several metabolic changes and predisposes women to some diseases related to this change in metabolism, including osteoporosis. Among the current treatment possibilities for this condition are oral bisphosphonates (anti-bone remodeling drugs), such as zoledronic acid. However, the systemic administration of such medications is related to several long-term adverse effects and, because of it, it is necessary to study local possibilities for improving compromised bone tissue. The purpose of this study was to evaluate and characterize peri-implant bone repair in osteoporotic rats using implants functionalized with some combinations of drugs that will have local effects on the repair process. Therefore, titanium implants were functionalized with zoledronic acid, zoledronic acid + teriparatide or zoledronic acid + ruterpy using the Dip-coating technique and, subsequently, with the aim of characterizing the impact of such surfaces on peri-operative repair implant, in vivo procedures were performed. Thus, 44 rats were divided into 4 groups according to the type of surface treatment of the implants to be installed in their tibial metaphyses: CONV (implants without surface functionalization), ZOL (implants functionalized with zoledronic acid using the Dip-coating technique), ZOL + TERI (implants functionalized with zoledronic acid + teriparatide using the Dip-coating technique) and ZOL + TERPY (implants functionalized with zoledronic acid + ruterpy using the Dip-coating technique). The groups underwent bilateral ovariectomy surgery and had the implants installed after 3 months, in order to induce osteoporosis. Each animal received two implants, one in each tibial metaphysis, bilaterally. Euthanasia occurred 28 days after implant installation. Three-dimensional microtomography (Micro-CT) and qualitative histological analyzes were performed. The data were subjected to the homoscedasticity test followed by the One-Way Anova test and the Tukey post-test with a significance level of 5%. There was a statistically significant difference between the OVX CONV group and the OVX ZOL, OVX ZOL + TERI and OVX ZOL + TERPY groups in bone volume settings (BV.TV), number of bone trabeculae (Tb.N), separation between bone trabeculae (Tb.S), total porosity of the bone tissue (Po.tot) and contact interface between bone and implant (I.S); Between the OVX ZOL, OVX ZOL + TERI

and OVX ZOL + TERPY groups, on the other hand, there was no statistical difference in any of the analyzed parameters, however particularly better results were found in the OVX ZOL + TERI group. Histologically, the OVX ZOL + TERI and OVX ZOL + TERPY groups demonstrated greater neoformation of bone tissue in the peri-implant region when compared to the OVX CONV and OVX ZOL groups, also with better results for OVX ZOL + TERI. Therefore, all groups with surface functionalization performed better than the control group, with better results likely for OVX ZOL + TERI. However, further analyzes are needed to confirm this finding and investigate the consolidation of bone formation in the long term.

Keywords: Osteoporosis. Dental Implants. Teriparatide. Zoledronic Acid. Ruterpy.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Linha do tempo englobando os procedimentos realizados no estudo	37
Figura 2 – Implantes estabilizados em aparato a base de alginato prontos para receberem a funcionalização de superfície	39
Figuras 3 – Soluções contendo ácido zoledrônico (ZOL), teriaratida (TERI) e ruterpy (TERPY)	39
Figura 4 - Procedimento de instalação dos implantes nas metáfises tibiais dos animais	
Figuras 5 e 6 - Reconstruções radiográficas tridimensionais do grupo OVX CONV ilustrando a formação óssea peri-implantar em cortes coronal e axial	53
Figuras 7 e 8 - Reconstruções radiográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL ilustrando a formação óssea peri-implantar em cortes coronal e axial	53
Figuras 9 e 10 - Reconstruções radiográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL + TERI ilustrando a formação óssea peri-implantar em cortes coronal e axial	54
Figuras 11 e 12 - Reconstruções radiográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL + TERPY ilustrando a formação óssea peri-implantar em cortes coronal e axial	54
Figura 13 - Coloração das lâminas dos grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI E OVX ZOL + TERPY por hematoxilina e eosina em aumentos de 4,10 e 20x	56

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos experimentais de acordo com a superfície dos implantes a serem instalados	36
---	----

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY, OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	47
Gráfico 2 - Quantificação da espessura das trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY , OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	48
Gráfico 3 - Quantificação do número de trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY, OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	49
Gráfico 4 - Quantificação da separação entre as trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY, OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	50
Gráfico 5 - Quantificação da porosidade total do tecido ósseo. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY, OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	51
Gráfico 6 - Quantificação da interface osso-implante. Comparação entre os grupos SHAM CONV, SHAM ZOL + TERPY, OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY	52

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
®	Registrado
°C	Graus célsius
µg	Microgramas
BIC	Superfície de intersecção entre osso e implante
BV/TV	Pocentagem de volume ósseo
CEUA	Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animais
Cm	Centímetros
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Matriz extracelular
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	Food and Drug Administration
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
H	Hora
IM	Intramuscular
IOF	International Osteoporosis Foundation
Mg/kg	Miligramas por kilograma
Micro-CT	Microtomografia computadorizada
µl	Microlitros
Mm	Milímetros
n	Número
N	Newton
Ng	Nanogramas
OVX	Ovariectomizado
Po (tot)	Porosidade total
PTH	1-34 Teriparatida
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante
ROI	Região de interesse
Rpm	Rotações por minuto
SHAM	Cirurgia fictícia
Tb.N	Número de trabéculas ósseas
Tb.S	Separação entre as trabéculas ósseas

Tb.Th	Espessura das trabéculas ósseas
TERI	Teriparatida
TERPY	Ruterpy
UI	Unidade internacional
Unesp	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
ZOL	Ácido zoledrônico

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	OBJETIVO	33
3	METODOLOGIA	35
3.1	Animais	36
3.2	Delineamento do modelo experimental	37
3.3	Implantes utilizados na pesquisa	38
3.4	Tratamento medicamentoso na superfície dos implantes	38
3.5	Experimentos com o modelo experimental de osteoporose	40
3.6	Ciclo estral	40
3.7	Ovariectomia	41
3.8	Cirurgia para instalação dos implantes osseointegráveis nas tíbias	41
3.9	Eutanásia	43
3.10	Processamento dos tecidos calcificados	43
3.11	Análise microtomográfica tridimensional (Micro-CT)	44
3.12	Processamento dos tecidos descalcificados	44
3.13	Análise histológica qualitativa	45
3.14	Análise estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Confirmação da eficiência cirurgia de ovariectomia bilateral	47
4.2	Resultados microtomográficos tridimensionais (Micro-CT)	47
4.3	Reconstruções microtomográficas tridimensionais (Software Ctvox®)	52
4.4	Resultados da análise histológica qualitativa	55
4.4.1	Grupo OVX CONV	55
4.4.2	Grupo OVX ZOL	55
4.4.3	Grupo OVX ZOL + TERI	55
4.4.4	Grupo OVX ZOL + TERPY	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	68

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Devido à incessante evolução tecnológica no campo da medicina e da saúde e à expansão do acesso ao saneamento básico, principalmente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, é possível notar uma tendência ao aumento da expectativa de vida da população. Um estudo recente que analisou 35 países industrializados concluiu que, em todos eles, há uma grande probabilidade de que seus cidadãos vivam mais em 2030 do que em 2020 (1).

Entretanto, uma maior longevidade também traz algumas consequências, como, por exemplo, o aumento da prevalência de doenças metabólicas. A osteoporose, doença óssea metabólica caracterizada por um aumento da susceptibilidade à fraturas devido à fragilidade, diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo (2) é uma condição intimamente relacionada com o processo de envelhecimento, visto que, com a chegada da menopausa e andropausa, há uma diminuição intensa da produção de hormônios sexuais, dentre eles o estrogênio (nas mulheres), importante inibidor da reabsorção óssea por regular diretamente a inibição de osteoclastos e proliferação de osteoblastos (3,4).

Uma maior longevidade populacional também acarreta em uma maior procura por tratamentos reabilitadores, e, dentre eles, pelas reabilitações com implantes osseointegráveis. Com altíssima taxa de sucesso (5), os implantes dentários são considerados atualmente a alternativa “padrão ouro” para a reabilitação de pacientes parcialmente ou totalmente desdentados, permitindo excelente eficiência mastigatória e força de mordida (6,7). Porém, o sucesso do processo de osseointegração, definido como o contato direto entre osso e implante quando submetido à carga funcional em nível de microscopia óptica (8), é muito dependente das condições orgânicas do indivíduo e, conseqüentemente, de seu tecido ósseo. A osteoporose, nesse cenário, prejudicaria tal processo. De acordo com alguns autores, osso de pacientes osteoporóticos se assemelharia a um osso tipo IV (no qual há a presença de grande quantidade de osso medular de baixa qualidade circundada por uma fina camada de osso cortical), e por esse motivo, a instalação de implantes osseointegráveis nesse grupo de pacientes seria contra-indicada (9). Apesar de algumas revisões sistemáticas que abordam o tema osseointegração na presença de osteoporose concluírem que não há contraindicação para este tipo de tratamento nesses pacientes

e também que não há diferença estatística com relação à taxa de sobrevivência desses implantes quando comparada a do grupo sem osteoporose (10,11), ainda não há consenso na literatura acerca desse tema, visto que alguns estudos mostraram prejuízo na estabilidade dos implantes a longo prazo, com maior perda óssea marginal ao redor destes (12), maior taxa de falha dos mesmos (13) e, em um estudo animal, foi encontrada menor expressão de ECM (matriz extracelular) no grupo osteoporótico, o que, segundo os autores, poderia comprometer a estabilidade biomecânica a longo prazo (14).

O tratamento considerado atualmente como “padrão ouro” para a osteoporose envolve o uso de bisfosfonatos sistêmicos, agentes anti-reabsortivos ósseos que estimulam a apoptose dos osteoclastos, retardando, assim, a reabsorção óssea e consequentemente seu *turnover* (15). Embora apresentem efeitos muito desejáveis no tecido ósseo, diminuindo a incidência de fraturas patológicas e a perda de massa óssea, tal classe de medicamentos pode levar a diversos efeitos colaterais indesejáveis em diversos sistemas corporais, como no gastrointestinal, urinário, imunológico e ocular, além de toxidermia, toxicidade ao sistema nervoso central (16) e osteonecrose dos maxilares. Visto isso, diversos órgãos e associações médicas competentes, como a IOF (International Osteoporosis Foundation), já discutem o real custo x benefício da utilização de tais fármacos.

Tendo em vista, então, um possível cenário futuro no qual pacientes osteoporóticos com necessidade de realização de implantes osseointegráveis para reabilitação oral e não usuários de bisfosfonatos sistêmicos existam, é imperativo que se investigue outras alternativas para promover o sucesso dos implantes osseointegráveis, como, por exemplo, alternativas locais de melhoria do tecido ósseo através de estudos pré-clínicos em modelos animais.

Nesse contexto, a funcionalização da superfície de implantes osseointegráveis com moléculas bioativas, de forma a promover um “drug delivery” a partir de “coatings” pela técnica de Dip-coating para possam melhorar o reparo ósseo peri-implantar frente a interferências sistêmicas parece ser uma excelente linha de pesquisa, inclusive já executada por nosso grupo. Tal metodologia tem o intuito de desencadear respostas celulares locais que favoreçam o reparo peri-implantar.

Dentre algumas opções de moléculas bioativas já testadas em modelos animais

pelo nosso laboratório existem a teriparatida (PTH 1-34) e a ruterpy. A teriparatida (PTH 1-34), um análogo do paratormônio, é uma substância anabólica óssea que, quando utilizada de forma intermitente, atua por meio da estimulação dos osteoblastos, promovendo uma maior formação óssea. Aprovada para uso pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos, comercialmente é encontrada com o nome de Forteo®, sendo geralmente administrada de maneira sistêmica em conjunto com os bisfosfonatos para tratamento da osteoporose (17). Alguns trabalhos anteriores de nosso grupo de pesquisa já utilizaram a teriparatida na superfície de implantes e obtiveram resultados interessantes no quesito reparo peri-implantar (processo 18/03114-0).

A ruterpy (Ru(terpy)(bdq)NO₃⁺), um fármaco sintetizado pela FCFRP (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto — USP), é um complexo de rutênio que atua como doador de óxido nítrico. A importância do óxido nítrico, naturalmente produzido no corpo humano pelas células endoteliais, no reparo ósseo, está fundamentada em seu papel perante à vasodilatação e angiogênese, visto que possui influência direta na produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e também na inibição da apoptose de células endoteliais. Dessa maneira, por ser doadora de óxido nítrico, a ruterpy possibilita o aumento da produção desse mediador. Assim como a teriparatida, tal substância também já foi alvo de estudo por nosso grupo, mostrando ser benéfica para a osseointegração. Os resultados dos trabalhos que utilizaram a teriparatida e a ruterpy, inclusive, possibilitaram a deposição de patentes (BR 10 2021 019548 7) e (BR 10 2021 025891 8).

Já o ácido zoledrônico, anti-reabsortivo pertencente à classe de bisfosfonatos nitrogenados (altamente potentes) com atuação apenas no tecido ósseo, é um dos mais potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos conhecidos atualmente, sendo um dos agentes mais eficazes para controle da osteoporose (18). Embora ainda não estudado por nosso grupo de pesquisa, sua alta capacidade de inibição da reabsorção óssea desperta questionamentos acerca de sua possível efetividade se utilizado ao redor de implantes pela técnica de Dip-coating. Além disso, diversos estudos na literatura já o utilizaram isoladamente ao redor de implantes em modelos de ratas saudáveis, com osteoporose e com deficiência de estrógeno, obtendo resultados interessantes (19-25).

Assim, a ideia de utilizar tais moléculas bioativas de maneira local, ao redor de

implantes, pela técnica de Dip-coating, com o intuito de estudar sua ação no reparo ósseo peri-implantar frente à osteoporose, parece ser de grande valia, já que sua ação quando utilizadas de maneira sistêmica é benéfica para tal condição. Entretanto, nenhum estudo disponível na literatura utilizou mais de uma biomolécula ao redor de implantes pela técnica de Dip-coating. Por esse motivo, a proposta deste estudo é avaliar tais substâncias acima (teriparatida, ruterpy e ácido zoledrônico) agindo conjuntamente e de maneira sinérgica no osso peri-implantar através de sua agregação na superfície de implantes pela técnica de Dip-coating. Tais implantes podem ser chamados de "sistemas inteligentes de liberação de biomoléculas" pois a liberação das substâncias agregadas a eles será inteligente, de maneira que primariamente um fármaco anti-reabsortivo esteja presente no tecido ósseo, inibindo sua reabsorção, e posteriormente um fármaco osteoformador ou liberador de óxido nítrico seja disponibilizado, agindo na formação óssea ou na vasodilatação. Vale destacar que ambas as respostas são de grande valia para favorecer as etapas celulares que ocorrem durante o processo de reparo ósseo. Assim, será possível observar se essas novas superfícies de implantes podem promover ações aprimoradas ou melhoradas às que já são obtidas pelas superfícies convencionais, uma vez que as biomoléculas incorporadas de forma associada poderão ter efeitos sinérgicos sobre o reparo peri-implantar pela sua liberação ordenada neste leito ósseo.

Objetivo

2 OBJETIVO

O presente estudo buscou avaliar e caracterizar o processo de reparo peri-implantar perante à administração local de ácido zoledrônico isoladamente, ácido zoledrônico + teriparatida e ácido zoledrônico + ruterpy através da funcionalização, pela técnica Dip-coating, da superfície de implantes em modelos de ratas osteoporóticas com o intuito de elucidar se a associação e liberação ordenada de tais biomoléculas de maneira local seria benéfica e teria ação sinérgica para a osseointegração.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Os procedimentos a serem executados no presente estudo foram submetidos à apreciação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta instituição e, após sua aprovação (protocolo nº 0520-2022), os mesmos foram iniciados. Foram utilizadas 44 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, adultas, com idade de 3 a 4 meses no início do experimento, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba — UNESP. Durante todo o experimento as ratas foram mantidas em ambiente climatizado, com temperatura estável ($22\pm 2^{\circ}$ C) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas e alimentadas com ração sólida (ração balanceada [Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil]) e água *ad libitum*. 90 dias após a realização da ovariectomia bilateral os animais foram alocados aleatoriamente em 4 grupos (OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL +TERI e OVX ZOL + TERPY) de acordo com a superfície dos implantes a serem instalados, sendo OVX CONV = grupo em que foram instalados implantes convencionais, sem funcionalização de superfície; OVX ZOL = grupo em que foram instalados os implantes funcionalizados com ácido zoledrônico pela técnica de Dip-coating; OVX ZOL + TERI = grupo em que foram instalados os implantes funcionalizados com ácido zoledrônico e teriparatida pela técnica de Dip-coating e OVX ZOL + TERPY = grupo em que foram instalados implantes funcionalizados com ácido zoledrônico e ruterpy pela técnica de Dip-coating (**Quadro 1**), totalizando um N=44 ratas, sendo 11 ratas por grupo.

Quadro 1 - Grupos experimentais de acordo com a superfície dos implantes a serem instalados

<i>Superfície dos implantes</i>	<i>N</i>	
OVX CONV	11	Grupo em que foram instalados implantes convencionais, sem funcionalização de superfície.
OVX ZOL	11	Grupo em que foram instalados os implantes funcionalizados com ácido zoledrônico pela técnica de Dip-coating.
OVX ZOL + TERI	11	Grupo em que foram instalados os implantes funcionalizados com ácido zoledrônico e teriparatida pela técnica de Dip-coating.

OVX ZOL + TERPY	11	Grupo em que foram instalados implantes funcionalizados com ácido zoledrônico e ruterpy pela técnica de Dip-coating.
------------------------	----	--

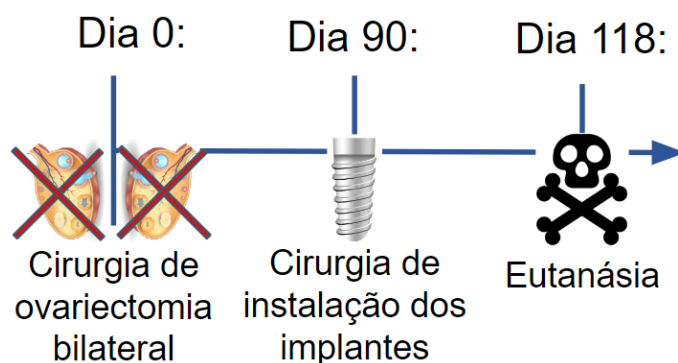
Fonte: Autor, 2024

3.2 Delineamento do modelo experimental

A linha do tempo englobando os procedimentos experimentais realizados pode ser visualizada na Figura 1. Foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, submetidas à cirurgia de ovariectomia, quando foi avaliado o reparo ósseo peri-implantar. Os fármacos administrados localmente foram: o ácido zoledrônico, o ácido zoledrônico + teriparatida e o ácido zoledrônico + ruterpy. Essas substâncias foram incorporadas aos implantes a serem instalados nas metáfises tibiais das ratas. As análises propostas para este estudo foram a análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT) e análise histológica qualitativa.

No dia 0, as ratas selecionadas para o experimento foram submetidas à cirurgia de ovariectomia bilateral. Passados 90 dias (dia 90), a instalação dos implantes na metáfises tibiais foi realizada. Aos 28 dias após a instalação dos implantes (dia 118), os animais foram eutanasiados e uma das tíbias de cada animal foi reservada para o escaneamento por microtomógrafo computadorizado e a outra, para a análise histológica, aleatoriamente. Para isso, os animais foram identificados por uma sequência numérica e alocados aleatoriamente em 2 grupos (tíbia direita – M-CT/tíbia esquerda – H) e (tíbia direita – H/tíbia esquerda – M-CT), sendo randomização dos mesmos realizada pelo software Excel 2016.

Figura 1 – Linha do tempo englobando os procedimentos realizados no estudo



Fonte: Autor, 2024.

3.3 Implantes utilizados na pesquisa

Foram utilizados implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseados no conceito de duplo ataque ácido (Medens®, Brasil) com diâmetro de 1,4mm e altura de 2,7mm, esterilizados por raios gama.

3.4 Tratamento medicamentoso na superfície dos implantes

Os implantes foram funcionalizados através da técnica de incorporação por Dip-coating, que consiste na imersão dos mesmos em uma solução contendo a molécula desejada, com a finalidade de formar camadas ao redor deles. Para isso, suas conexões (hexágono interno) foram acopladas a pontas de pipeta de tamanho correspondente (para o estudo em questão foram utilizadas pontas de 100mL) que em seguida foram também estabilizadas, pela base, em um aparato a base de alginato (Figura 2), possibilitando que os implantes não fossem tocados durante e também após o processo de funcionalização, assegurando a formação de camadas uniformes. Assim, foram realizadas 5 ou 6 camadas ao redor dos mesmos (dependendo do grupo experimental), de acordo com a necessidade observada através dos testes preliminares (um maior número de camadas garantiu que, durante a inserção dos implantes no leito cirúrgico, a funcionalização da superfície não fosse perdida). As moléculas utilizadas na funcionalização foram o ácido zoledrônico, a ruterpy e a teriparatida, dependendo do grupo. Nos implantes que seriam instalados no grupo OVX ZOL foram realizadas 5 camadas (5 mergulhos com intervalo de 1 dia entre eles) de funcionalização com ácido zoledrônico, enquanto para os grupos OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY foram realizadas 6 camadas de funcionalização (6 mergulhos também com intervalo de 1 dia entre os mesmos), sendo as primeiras 3 de teriparatida ou ruterpy, dependendo do grupo, e as 3 últimas de ácido zoledrônico. Após a secagem de todas as camadas desejadas, os mesmos foram instalados nos animais de seus respectivos grupos.

Figura 2 – Implantes estabilizados em aparato a base de alginato prontos para receberem a funcionalização de superfície



Fonte: Autor, 2024.

Figura 3 – Soluções contendo ácido zoledrônico (ZOL) , teriparatida (TERI) e ruterpy (TERPY)



Fonte: Autor, 2024.

As concentrações das soluções contendo teriparatida (PTH 1-34) e ruterpy já haviam sido estabelecidas, sendo a solução de teriparatida composta por 20µL da mesma diluídos em 50mL de água Milli-Q® + 50mL de DMSO e a de ruterpy, por 10mL de uma solução mais concentrada de ruterpy diluídos em 40mL de água Milli-Q® + 50mL de DMSO. A solução mais concentrada foi composta por 25mg de ruterpy diluídos em 50mL de água Milli-Q®. A concentração da solução contendo ácido zoledrônico, por outro lado, foi determinada baseada em outros estudos presentes na literatura (26-29), sendo composta por 1mg de ácido zoledrônico diluído em 1mL de água Milli-Q® + 99mL de DMSO.

As soluções, após preparadas, foram armazenadas em béqueres de 100mL, mantidas em ambiente com temperatura de 18°C e descartadas após o término do processo de funcionalização.

3.5 Experimentos com o modelo experimental de osteoporose

Após a funcionalização dos implantes foram realizados os experimentos *in vivo* no modelo experimental de osteoporose, proposto para este estudo. Com o objetivo de avaliar a ação sinérgica entre fármacos administrados localmente, buscou-se, neste momento, caracterizar de uma forma geral as respostas iniciais do tecido ósseo peri-implantar quanto aos eventos formação, reabsorção e mineralização óssea.

Vale destacar que foi utilizado o modelo de instalação de implantes nas metáfises tibiais das ratas, com o intuito de avaliar o efeito da osteoporose sobre esses ossos e qual a possível melhora desse quadro frente a funcionalização de superfície dos implantes com ácido zoledrônico, ácido zoledrônico + teriparatida e ácido zoledrônico + ruterpy pela técnica de Dip-coating.

3.6 Ciclo estral

Para garantir que as ratas utilizadas nos experimentos estivessem ciclando normalmente as mesmas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina histológica para leitura microscópica imediata

(técnica de Long & Evans, 1922) (30), visando reconhecimento das fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares. Tal técnica foi utilizada novamente após a cirurgia de ovariectomia bilateral com o intuito de validar a efetividade do procedimento.

3.7 Ovariectomia

Após oito horas de jejum as ratas foram anestesiadas via intramuscular com 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (cloridrato de xilazina 2% injetável, Syntec, Tamboré-SP, Brasil) e 50mg/Kg de cloridrato de quetamina (cloridrato de quetamina injetável, Vetnil, Louveira-SP, Brasil) e imobilizadas sobre prancha cirúrgica. Após a tricotomia da região a ser operada, foi realizada anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto-SP, Brasil), associado à PVPI tópico, e, em posição de decúbito lateral, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1cm nos flancos, divulsão por planos do tecido subcutâneo e, em seguida, do peritônio a fim de ter acesso à cavidade abdominal. Em seguida, foram localizados os ovários e os cornos uterinos, que foram laqueados com fio monofilamentar (Nylon 5-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos-SP, Brasil) e removidos cirurgicamente. A sutura foi realizada por planos, com pontos interrompidos com fio monofilamentar (Nylon 5-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos-SP, Brasil) nos planos internos e com fio multifamentar (Seda 4-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos-SP, Brasil) no plano mais externo. Como medida profilática, imediatamente após a cirurgia foi utilizado 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas-SP, Brasil) por via intramuscular em todos os animais (31).

3.8 Cirurgia para instalação dos implantes ósseointegráveis nas tíbias

Após 90 dias da ovariectomia bilateral ou cirurgia fictícia (dia 90) as ratas foram submetidas à instalação dos implantes em suas metáfises tíbiais. Seguindo o mesmo raciocínio utilizado na cirurgia de ovariectomia bilateral, os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico e anestesiados via

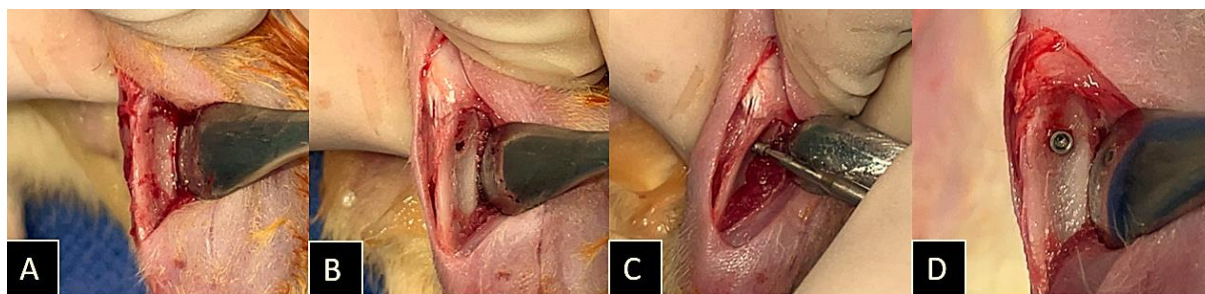
intramuscular com 50mg/Kg de cloridrato de quetamina (cloridrato de quetamina injetável, Vetnil, Louveira-SP, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (cloridrato de xilazina 2% injetável, Syntec, Tamboré-SP, Brasil). Após a anestesia, foram realizadas a tricotomia na porção medial das tíbias direita e esquerda e a anti-sepsia da região a ser incisada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado à PVPI tópico.

Com uma lâmina de número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo-To, Japão), foi realizada uma incisão de aproximadamente 1cm de comprimento na região das metáfises tibiais esquerda e direita e, a seguir, o tecido mole local foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo, expondo o osso para receber os implantes. Foram instalados 88 implantes (2 por animal) de titânio comercialmente puro grau IV, com diâmetro de 1,4 mm e altura de 2,7 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,1 mm de diâmetro nas duas corticais, montadas em motorelétrico (BLM600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto-SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) (Figura 4).

Os tecidos foram suturados por planos com pontos interrompidos, sendo com fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) nos planos internos e no plano mais externo, com fio multifilamentar (Seda 4-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). No pós-operatório imediato cada animal recebeu uma dose intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas-SP, Brasil).

Vale destacar que um experimento foi realizado no nosso laboratório viabilizando a instalação dos implantes em tíbias (CEUA 00199-2017).

Figura 4 – Procedimento de instalação dos implantes nas metáfises tibiais dos animais



A) Acesso à metáfise tibial; B) Leito ósseo fresado bicorticalmente com fresa de 1,1mm de diâmetro; C) Instalação do implante com chave digital e D) Implante instalado em seu correto posicionamento.

Fonte: Autor, 2024.

3.9 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de anestésico aos 28 dias após a instalação dos implantes (dia 118). As tíbias foram coletadas, bilateralmente, para realização das análises de microtomografia computadorizada (Micro-CT) e histológica.

3.10 Processamento dos tecidos calcificados

Após o processamento das amostras para tecidos calcificados (fixação em formol tamponado 10% por 48 horas - Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva-SP, Brasil - lavagem em água corrente por 24h e armazenamento em álcool 70%) foi realizado o escaneamento por microtomógrafo computadorizado e a análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT). Esta análise teve o intuito de avaliar, morfológicamente e quantitativamente, o processo de reparo e a formação óssea peri-implantar e comparar os valores dos parâmetros obtidos entre os diferentes grupos experimentais.

Os parâmetros avaliados seguiram o guia para a avaliação da microarquitetura óssea em roedores usando microtomografia computadorizada publicado por Bouxsein et al. (32)

3.11 Avaliações microtomográficas tridimensionais (Micro-CT)

As peças foram escaneadas através do microtomógrafo Skyscan (SkyScan 1272 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003), utilizando cortes de 8µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de Al. 0,5mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0.4 mm, tamanho do pixel de 2016x1344 µm e com tempo de aquisição de 1h e 56min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com smoothing de 5, correção dos anéis de artefato de 10, correção de Beam Hardening de 40% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas, sendo avaliadas no plano transaxial.

Para realização das morfometrias o 3D foi utilizado o software CTAnalyser - CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0). A padronização da região de interesse (ROI) foi realizada através da metodologia BIC envolvendo a região de osso peri-implantar em contato com o implante. A partir da utilização da metodologia BIC, foram demarcados 150 slices correspondentes à porção medular, a partir do desaparecimento da cortical superior e aparecimento de osso medular. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza (threshold). O threshold utilizado na análise foi de 20-120 tons de cinza, que possibilitou a obtenção do volume e porosidade de osso formados ao redor dos implantes. A partir dessa conversão o software realizou o cálculo morfométrico aplicado ao ROI por meio dos parâmetros (BV/TV) percentual de volume ósseo; (Tb. N) número de trabéculas; (Tb. Sp) separação entre as trabéculas; (Tb.Th) espessura das trabéculas ósseas; (Po.Tot) porosidade total do tecido ósseo e (I.S) interface de contato entre osso e implante (32).

Com finalidade didática e ilustrativa, a reconstrução e manipulação das amostras em três dimensões foi também realizada no software CTvox (SkyScan, Versão 2.7).

3.12 Processamento dos tecidos descalcificados

Após o processamento das amostras para tecidos descalcificados (fixação em formol tamponado 10% por 48 horas - Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-

Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil, lavagem em água corrente por 24h e sucessivas trocas de EDTA 10% até a descalcificação – cerca de 16 trocas ou 8 semanas) foi realizada nova lavagem das peças em água corrente por 24h, diafanização das peças em xilol, inclusão em parafina, microtomia, obtenção de cortes com 6µm de espessura e montagem em lâminas. Posteriormente, os mesmos foram corados em hematoxilina e eosina para análise histológica qualitativa.

3.13 Análise histológica qualitativa

Após o processamento de descalcificação por EDTA 10%, as tíbias de cada grupo foram novamente lavadas em água corrente por 24h, desidratadas numa sequência crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A partir dos blocos obtidos, foram confeccionados cortes de 6µm pelo micrótomo (Leica RM2125 RTS). Na sequência, os cortes foram inseridos em lâminas histológicas e o conjunto (corte + lâmina) foi corado com hematoxilina, por 8 minutos, e eosina 1%, por 30 segundos.

Após a coloração, as lamínulas foram montadas e lâminas foram levadas ao microscópio óptico (Leica DM 750) com ampliação de 4x, 20x e 40x, para captura de imagens da região central da região peri-implantar com uma câmera digital para captura de imagens microscópicas (Leica BioSystems MC 170 HD). As imagens foram armazenadas em formato JPG.

3.14 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise de microtomografia computadorizada (Micro-CT) foram submetidos a análise estatística pelo software GraphPad Prism 7.03. Após a aplicação do teste de homocedasticidade de Shapiro Wilk e confirmada a distribuição normal dos dados, estes foram submetidos ao teste paramétrico de Análise de Variância Um Fator (ANOVA One Way), seguido do Pós teste de Tukey, quando necessário, para definir as diferenças observadas entre os grupos avaliados, sendo estabelecido o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

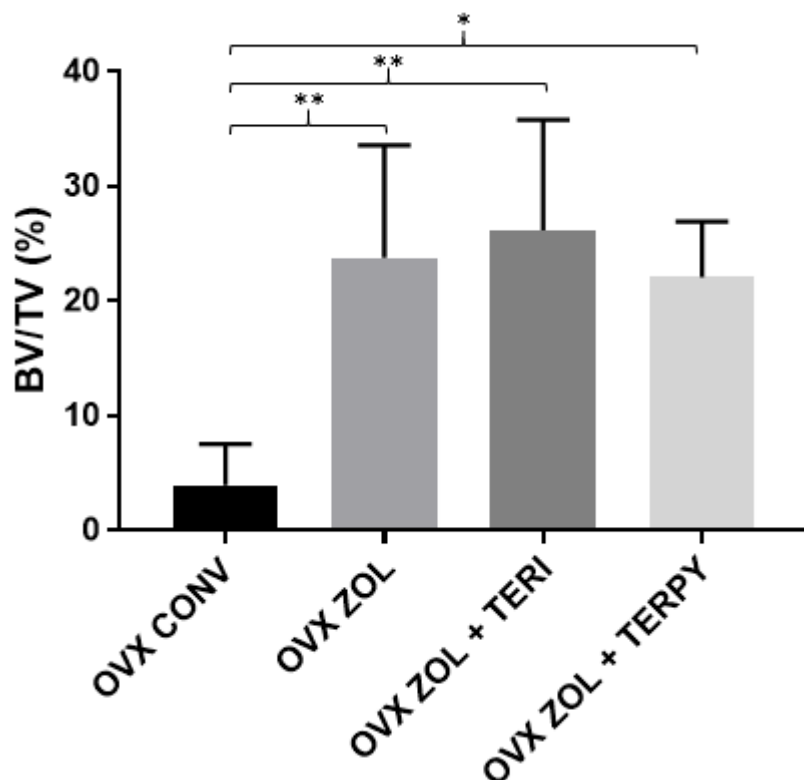
4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da eficiência da cirurgia de ovariectomia bilateral

Após 8 dias da cirurgia de ovariectomia bilateral o ciclo estral dos animais foi realizado, confirmando a permanência do diestro constante e, conseqüentemente, o sucesso do procedimento cirúrgico. A cirurgia de instalação dos implantes nas metáfises tibiais foi realizada após 90 dias da ovariectomia, momento no qual a osteoporose já havia sido instalada (33).

4.2 Resultados microtomográficos tridimensionais (Micro-CT)

Gráfico 1 - Quantificação do percentual de volume ósseo. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY



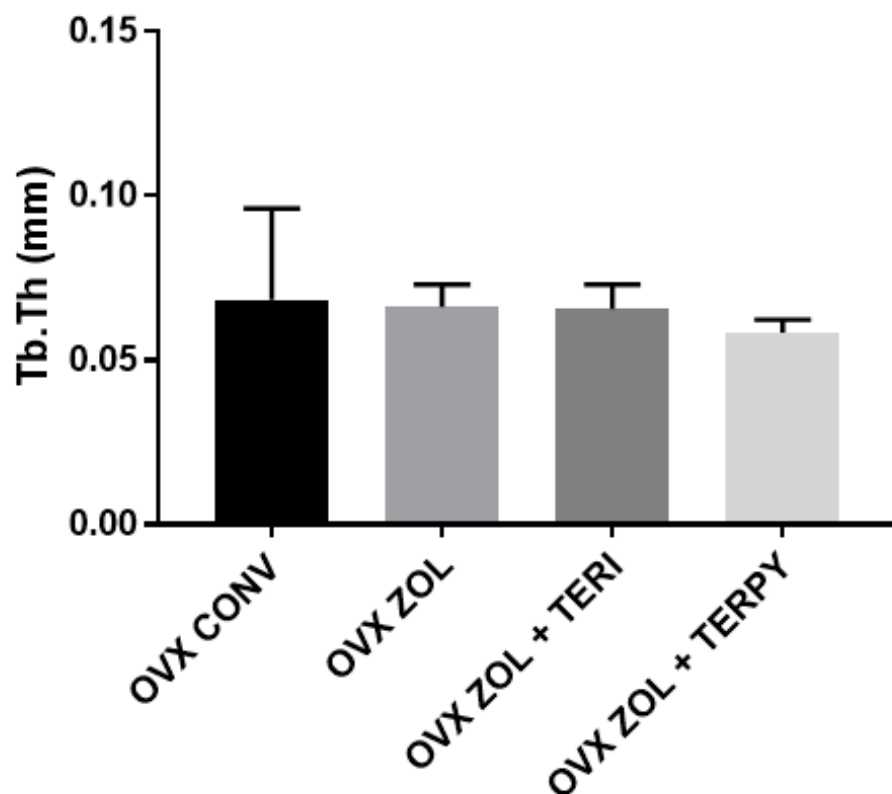
Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para percentual de volume ósseo (BV/TV) foram as seguintes: OVX CONV (3,91% ± 3,61), OVX ZOL (23,77% ± 9,81), OVX ZOL

+ TERI (26,15% $\pm$ 9,62) e OVX ZOL + TERPY (22,09% $\pm$ 4,81) (Gráfico 1).

Para o parâmetro BV/TV, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX CONV e todos os demais grupos experimentais (OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY). *: diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 2 - Quantificação da espessura das trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY

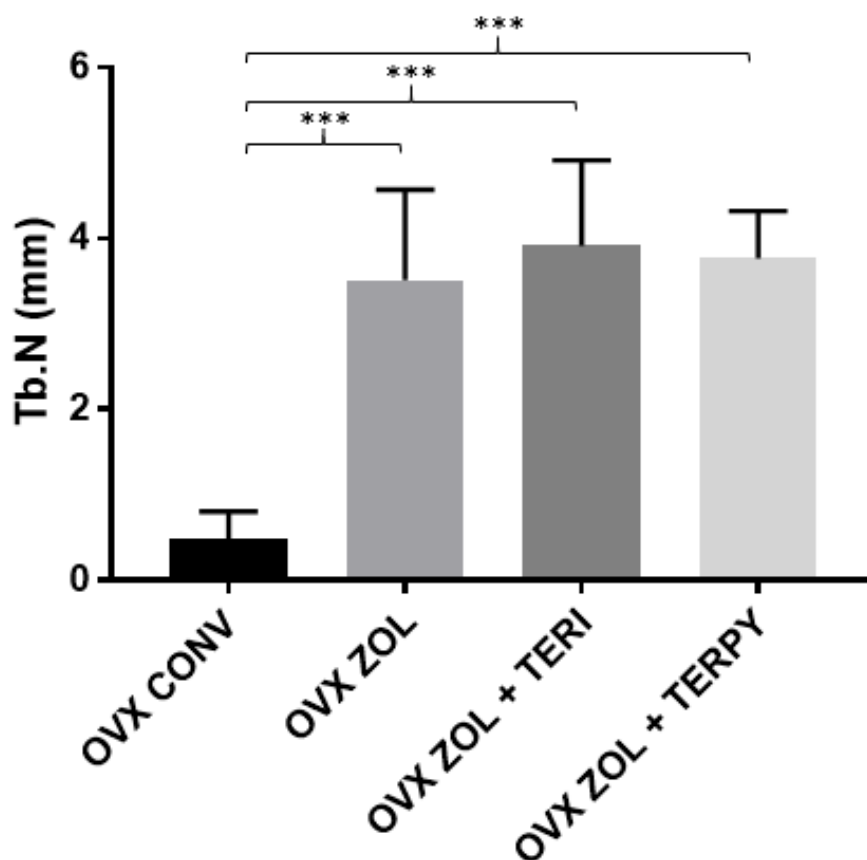


Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para a espessura das trabéculas (Tb.Th) foram as seguintes: OVX CONV (0,068mm $\pm$ 0,027), OVX ZOL (0,066mm $\pm$ 0,006), OVX ZOL + TERI (0,065mm $\pm$ 0,007) e OVX ZOL + TERPY (0,058mm $\pm$ 0,003) (Gráfico 2)

Para o parâmetro Tb.Th, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Gráfico 3 - Quantificação do número de trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY

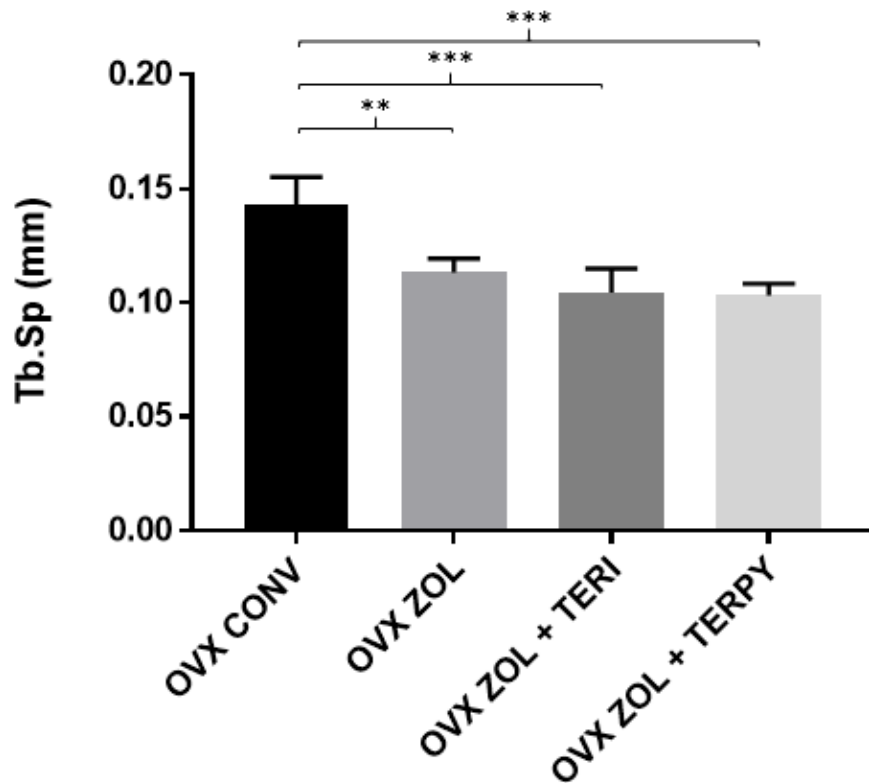


Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para o número de trabéculas (Tb.N) foram as seguintes: OVX CONV (0,47mm ± 0,32), OVX ZOL (3,51mm ± 1,05), OVX ZOL + TERI (3,91mm ± 1) e OVX ZOL + TERPY (3,76mm ± 0,55) (Gráfico 3).

Para o parâmetro Tb.N, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX CONV e todos os demais grupos experimentais (OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY). *: diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 4 - Quantificação da separação entre as trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY

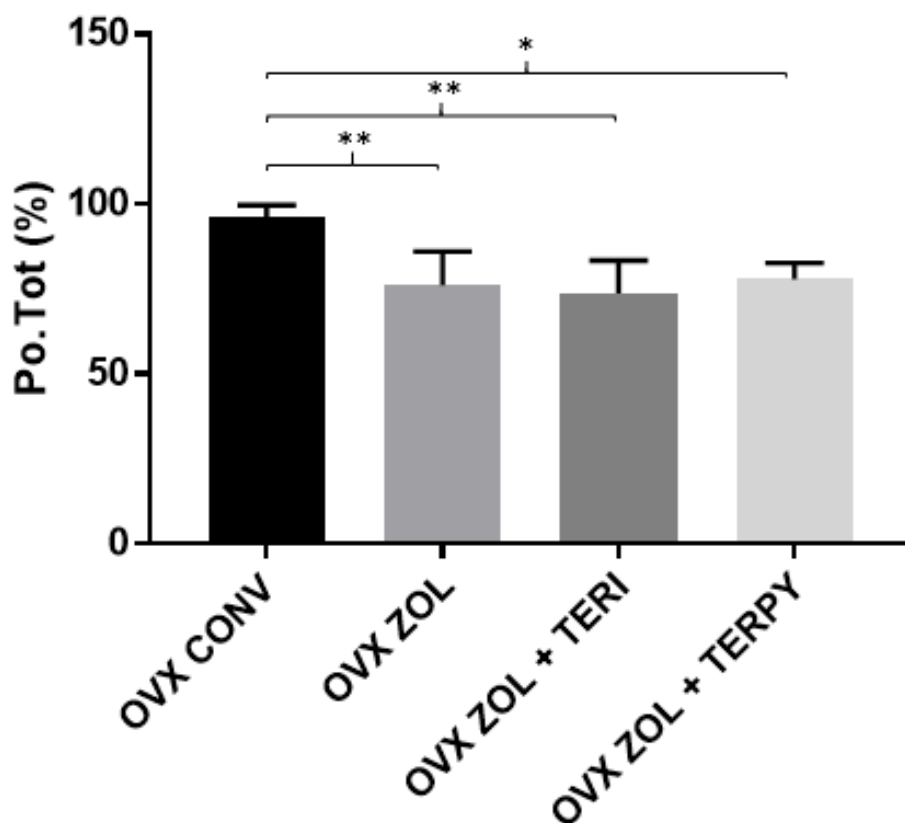


Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para a separação das trabéculas (Tb.Sp) foram as seguintes: OVX CONV (0,143mm $\pm$ 0,012), OVX ZOL (0,113mm $\pm$ 0,006), OVX ZOL + TERI (0,104mm $\pm$ 0,010) e OVX ZOL + TERPY (0,103mm $\pm$ 0,005) (Gráfico 4).

Para o parâmetro Tb.Sp, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX CONV e todos os demais grupos experimentais (OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY). *: diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 5 - Quantificação da porosidade total do tecido ósseo. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY

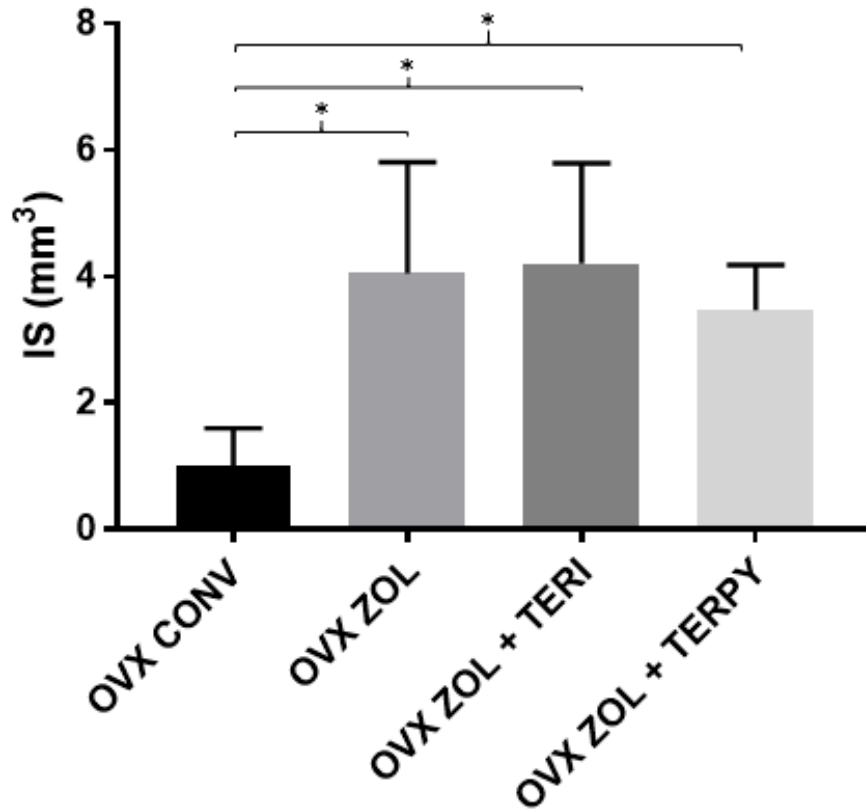


Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para a porosidade total do tecido ósseo (Po.Tot) foram as seguintes: OVX CONV (96,09% ± 3,61), OVX ZOL (76,23% ± 9,81), OVX ZOL + TERI (73,85% ± 9,62) e OVX ZOL + TERPY (77,91% ± 4,81) (Gráfico 5).

Para o parâmetro (Po.Tot), houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX CONV e todos os demais grupos experimentais (OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY). *: diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 6 - Quantificação da interface osso-implante. Comparação entre os grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY



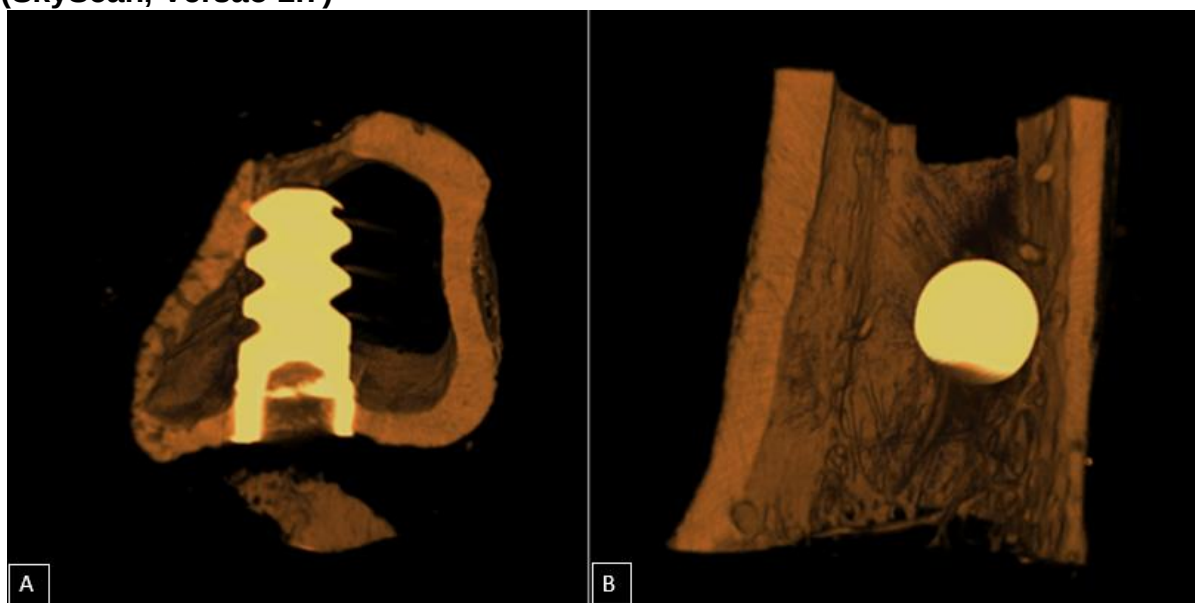
Fonte: Autor, 2024

As médias dos resultados obtidas para a interface de contato entre osso e implante (I.S) foram as seguintes: OVX CONV ($0,99\text{mm}^3 \pm 0,59$), OVX ZOL ($4,04\text{mm}^3 \pm 1,76$), OVX ZOL + TERI ($4,21\text{mm}^3 \pm 1,58$) e OVX ZOL + TERPY ($3,46\text{mm}^3 \pm 0,71$) (Gráfico 6).

Para o parâmetro I.S, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX CONV e todos os demais grupos experimentais (OVX ZOL, OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY). *: diferença estatisticamente significativa.

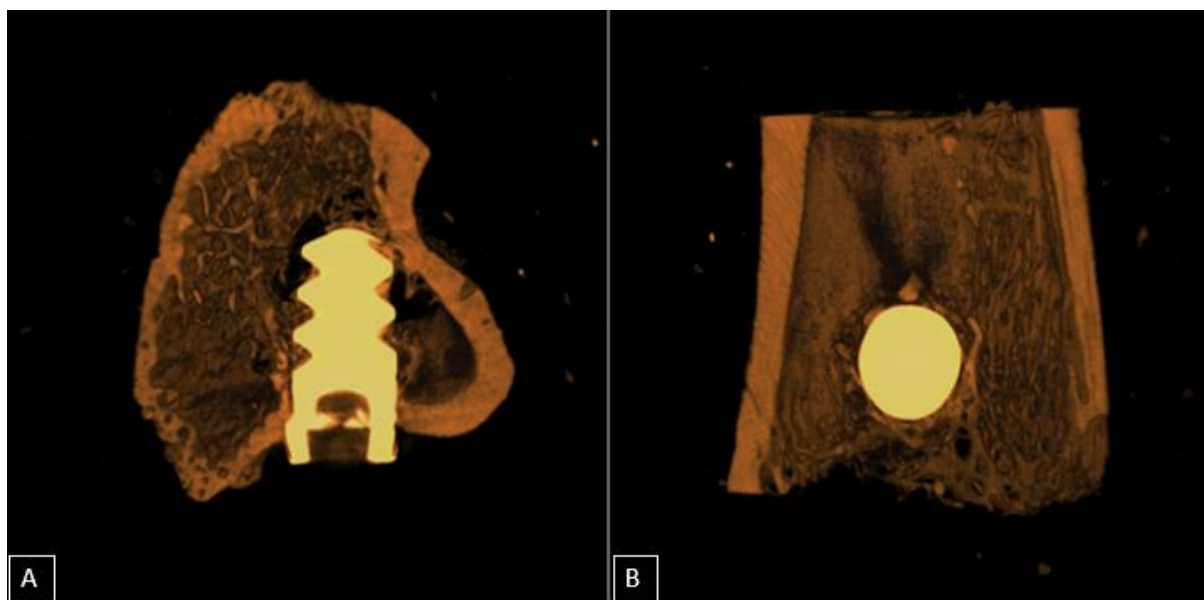
4.3 Reconstruções microtomográficas tridimensionais (Software CTvox®)

Figuras 6 e 7 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais do grupo OVX CONV ilustrando a formação óssea peri-implantar pelo software CTVox® (SkyScan, Versão 2.7)



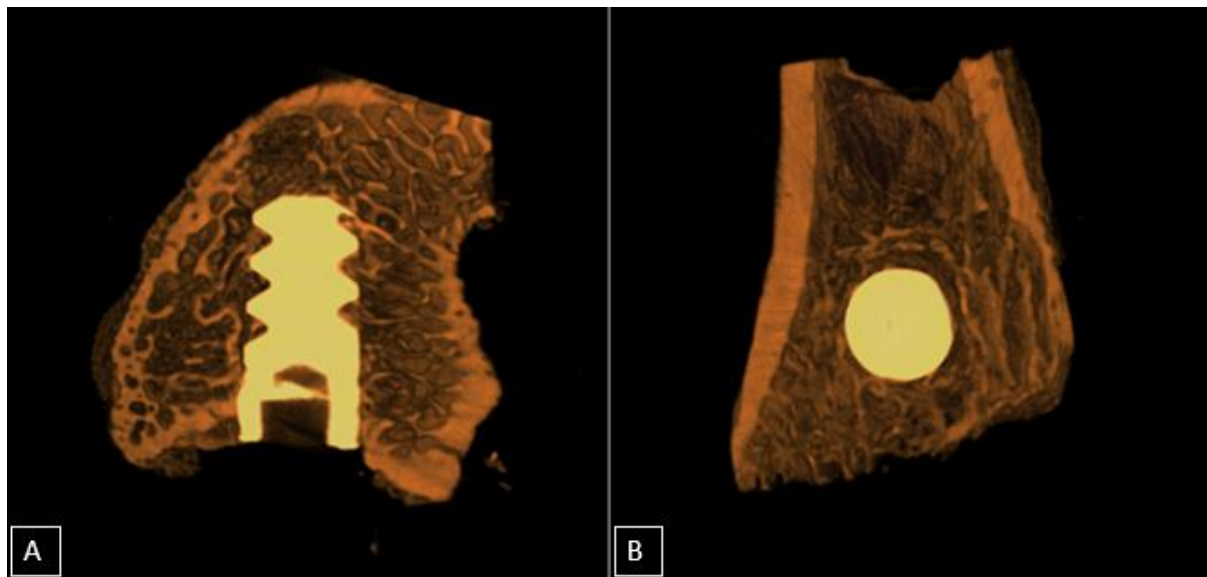
Fonte: Autor, 2024

Figuras 7 e 8 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL ilustrando a formação óssea peri-implantar pelo software CTVox® (SkyScan, Versão 2.7)



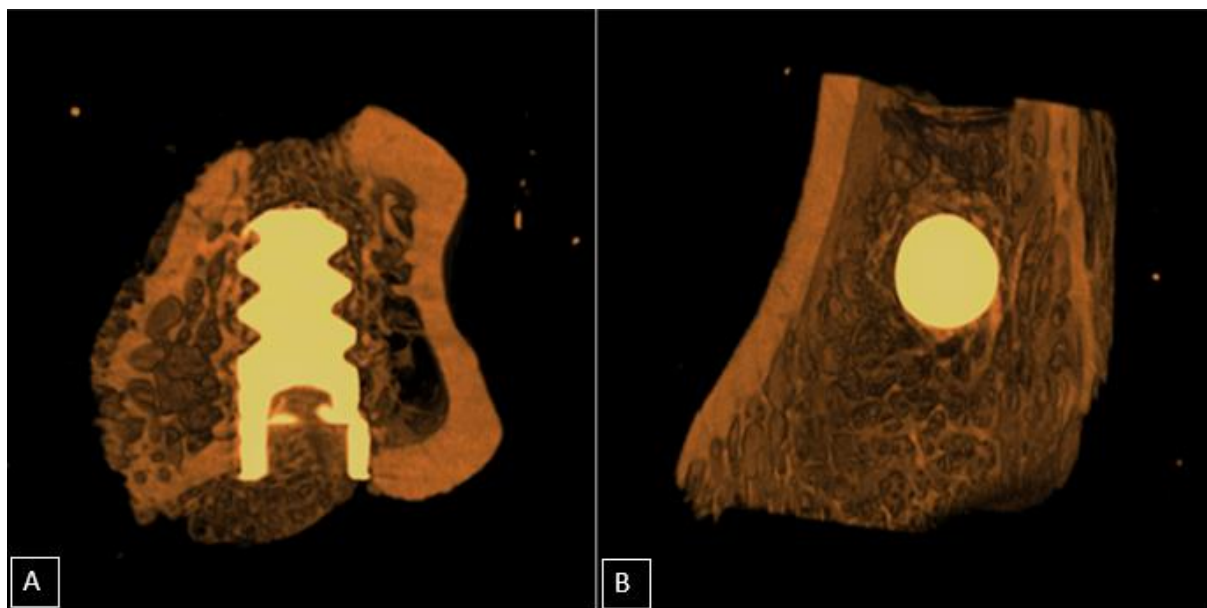
Fonte: Autor, 2024

Figuras 9 e 10 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL + TERI ilustrando a formação óssea peri-implantar pelo software CTVox® (SkyScan, Versão 2.7)



Fonte: Autor, 2024

Figuras 11 e 12 - Reconstruções microtomográficas tridimensionais do grupo OVX ZOL + TERPY ilustrando a formação óssea peri-implantar pelo software CTVox® (SkyScan, Versão 2.7)



Fonte: Autor, 2024

4.4 Análise Histológica Qualitativa

4.4.1 Grupo OVX CONV

Aos 28 dias pós-operatórios observa-se que o grupo OVX CONV não obteve tecido ósseo formado junto às espiras dos implantes. Grande quantidade de tecido conjuntivo não organizado foi observado na periferia da região peri-implantar e apenas ilhas discretas de matriz óssea mineralizada foram observadas na região cortical (figuras 5A, 5B e 5C).

4.4.2 Grupo OVX ZOL

Aos 28 dias pós-operatórios nota-se que o grupo OVX ZOL obteve a formação de tecido ósseo maduro entremeado a tecido conjuntivo junto às espiras dos implantes, sem predominância entre ambos. Também é possível observar a definição morfológica das espiras (figuras 5D, 5E e 5F).

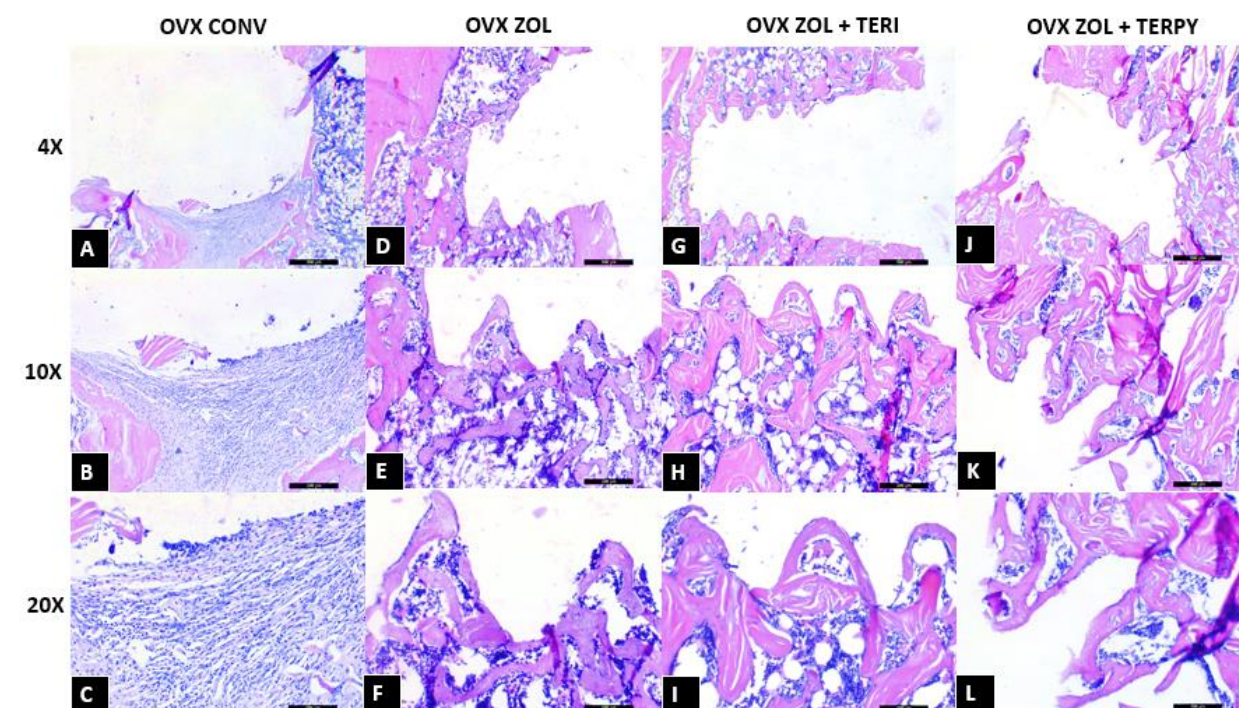
4.4.3 Grupo OVX ZOL + TERI

Aos 28 dias pós-operatórios o grupo OVX ZOL + TERI demonstrou a predominância de tecido ósseo maduro entremeado por menores quantidades de tecido conjuntivo junto às espiras dos implantes. Observa-se, também, nítida definição morfológica das mesmas (figuras 5G, 5H e 5I).

4.4.4 Grupo OVX ZOL + TERPY

Aos 28 dias pós-operatórios nota-se que o grupo OVX ZOL + TERPY também obteve a predominância de tecido ósseo maduro entremeado por menores quantidades de tecido conjuntivo junto às espiras dos implantes. Também é possível observar alguma definição das espiras (figuras 5J, 5K e 5L).

Figura 13 - Coloração das lâminas dos grupos OVX CONV, OVX ZOL, OVX ZOL + TERI E OVX ZOL + TERPY por hematoxilina e eosina em aumentos de 4x,10x e 20x



Fonte: Autor, 2023

Discussão

5 DISCUSSÃO

A indicação de bisfosfonatos sistêmicos para pacientes osteoporóticos vem sendo discutida com um olhar mais voltado para seu real custo-benefício nos últimos anos perante sua gama de efeitos colaterais indesejados no organismo (15, 34, 35). Entretanto, dentro deste mesmo cenário, a crescente expectativa de vida da população ao redor do mundo resultou em uma maior prevalência de pacientes osteoporóticos com necessidade de reabilitações orais que envolvam a instalação de implantes osseointegráveis. Tais pacientes possuem, quando não tratados, um tecido ósseo com características celulares, estruturais e biomecânicas desfavoráveis para a osseointegração (36). Assim, este estudou voltou sua investigação para a tentativa de melhorar, localmente, através da funcionalização de superfície de implantes com combinações de moléculas bioativas que promovem respostas celulares complementares entre si, características do tecido ósseo que tornam-se comprometidas pela presença da osteoporose.

Alguns trabalhos do nosso grupo de pesquisa já realizaram a funcionalização da superfície de implantes utilizando a teriparatida e a ruterpy, obtendo bons resultados (37,38). Entretanto, a associação dessas biomoléculas ao redor de implantes visando sua liberação ordenada em modelos de ratas osteoporóticas, e não osteopênicas apenas, ainda não havia sido estudada.

Corroborando com resultados anteriores já publicados (19-29), a liberação local peri-implantar de ácido zoledrônico no grupo OVX ZOL resultou em uma melhora significativa dos parâmetros morfológicos (volume do tecido ósseo – BV/TV, número de trabéculas ósseas – Tb.N, separação entre trabéculas ósseas – Tb.S, porosidade total do tecido ósseo – Po.Tot e interface de contato entre osso e implante – I.S) e histológicos (maior neoformação óssea peri-implantar) quando comparado ao grupo OVX CONV, reiterando a eficiência dessa medicação como anti-reabsortivo perante a presença da osteoporose. Além disso, promoveu melhores resultados que o alendronato quando este foi utilizado ao redor de implantes em ratas com deficiência de estrógeno (39).

Entretanto, quando é realizada a comparação entre o grupo OVX ZOL e os grupos OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY, não há diferenças significantes na análise de microtomografia computadorizada para nenhum dos parâmetros

analisados; na análise histológica qualitativa, por outro lado, os grupos com dupla funcionalização parecem demonstrar um padrão de maturidade e organização do tecido ósseo peri-implantar maior quando comparados ao grupo OVX ZOL – principalmente o grupo OVX ZOL + TERI - sugerindo que, embora a associação entre as medicações não tenha promovido uma melhoria óssea em âmbito estutural, histologicamente houve resposta positiva frente a tal associação.

Finalmente, na comparação entre os grupos OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY também não se observaram diferenças estatísticas significantes na análise de microtomografia computadorizada, entretanto nota-se um pequeno incremento nos valores dos parâmetros analisados no grupo OVX ZOL + TERI em relação ao grupo OVX ZOL + TERPY. Tal incremento pode ser corroborado pela análise qualitativa histológica do tecido peri-implantar.

De acordo com Kitagawa et.al (40), quando são efetuadas 5 camadas de funcionalização nos implantes por meio da técnica de Layer-by-layer (muito semelhante à técnica de Dip-coating, utilizada neste estudo), há a formação de uma camada única de 37nm de espessura que permite 14 dias de liberação contínua da medicação escolhida para a funcionalização no tecido ósseo. Seguindo o mesmo raciocínio, a formação de 6 camadas de funcionalização (realizadas nos grupos OVX ZOL + TERI e OVX ZOL + TERPY) ocasionaria a formação de uma camada única ligeiramente maior e, provavelmente, um tempo de liberação das medicações também ligeiramente maior, porém semelhantes aos relatados no estudo. A literatura mostra, em trabalhos que também utilizaram o modelo de instalação de implantes osseointegráveis em ratas osteoporóticas, que é possível encontrar tecido ósseo maduro após aproximadamente 21 dias da cirurgia (41), sendo as características deste, então, influenciadas por eventos bioquímicos e celulares que ocorreram antes desse período.

A presença das biomoléculas utilizadas neste estudo no leito peri-implantar em períodos importantes para a formação óssea foi evidenciada tanto pela análise de microtomografia computadorizada, que demonstrou a superioridades dos grupos com funcionalização de superfície em relação ao controle, quanto na análise histológica descritiva, que revelou, como já explanado, maior formação, maturação e organização do tecido ósseo nos grupos com dupla funcionalização em relação ao grupo funcionalizado apenas com ácido zoledrônico e também, neste, maior formação óssea

em relação ao grupo controle.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Portanto, todos os grupos com funcionalização de superfície obtiveram desempenho superior ao grupo controle, com prováveis melhores resultados para OVX ZOL + TERI. Porém, são necessárias mais análises para confirmação de tal achado e investigação da consolidação da formação óssea a longo prazo.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, Li G, Foreman K, Ezzati M. Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet*. 2017 Apr 1;389(10076):1323-35. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32381-9.
2. Anam AK, Insogna K. Update on Osteoporosis Screening and Management. *Med Clin North Am*. 2021 Nov;105(6):1117-34. doi: 10.1016/j.mcna.2021.05.016.
3. Guyton AC, Hall JE. *Fisiologia humana e mecanismos das doenças*. 6th ed Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 1998.
4. Jones CM, Boelaert K. The endocrinology of ageing: a mini-review. *Gerontology*. 2015;61(4):291-300. doi: 10.1159/000367692.
5. Brånemark PI. Vital microscopy of bone marrow in rabbit. *Scand J Clin Lab Invest*. 1959;11(Suppl.38):1-82.
6. Faverani LP, Ramalho-Ferreira G, Gaetti-Jardim EC, Okamoto R, Shinohara EH, Assunção WG, Garcia Júnior IR. Implantes osseointegrados: evolução sucesso. *Salusvita*. 2011;30(1):47-58.
7. Mancuso DN, Goiato MC, Gennari Filho H, Gomes EA. Bite force and masticatory efficiency in implant-retained dentures: literature review. *Dent Today*. 2008 Aug;27(8):56-9.
8. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental studies. *J Prosthet Dent*. 1983;50:399-410.
9. Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, Figueiredo LC, Cassoni A, Shibli JA. Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. *World J Orthop*. 2015 Mar 18;6(2):311-5. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.311.
10. Grisa A, Veitz-Keenan A. Is osteoporosis a risk factor for implant survival or failure? *Evid Based Dent*. 2018 Jun;19(2):51-52. doi: 10.1038/sj.ebd.6401307. PMID: 29930358.
11. Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ, Kademani D. Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants.

Int J Oral Maxillofac Implants. 2008 Sep-Oct;23(5):905-10. PMID: 19014161.

12. Gaetti-Jardim EC, Santiago-Junior JF, Goiato MC, Pellizer EP, Magro-Filho O, Jardim Junior EG. Dental implants in patients with osteoporosis: a clinical reality?J Craniofac Surg. 2011 May;22(3):1111-3. doi: 10.1097/SCS.0b013e3182108ec9.

13. Holahan CM, Koka S, Kennel KA, Weaver AL, Assad DA, Regennitter FJ, Kademani D. Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants. 2008 Sep-Oct;23(5):905-10.

14. Giro G, Chambrone L, Goldstein A, Rodrigues JA, Zenóbio E, Feres M, Figueiredo, LC, Cassoni A, Shibli JA. Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. World J Orthop. 2015 Mar 18;6(2):311-5. doi: 10.5312/wjo.v6.i2.311.PMID: 25793172; PMCID: PMC4363814.

15. Papapetrou PD. Bisphosphonate-associated adverse events. Hormones(Athens). 2009 Apr-Jun;8(2):96-110. doi: 10.14310/horm.2002.1226. PMID: 19570737.

16. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. Mayo Clin Proc. 2008 Sep;83(9):1032-45. doi: 10.4065/83.9.1032. PMID: 18775204; PMCID: PMC2667901.

17. Yuan F, Peng W, Yang C, Zheng J. Teriparatide versus bisphosphonates for treatment of postmenopausal osteoporosis: A meta-analysis. Int J Surg. 2019 Jun;66:1-11. doi: 10.1016/j.ijsu.2019.03.004. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30890377.

18. Dhillon S. Zoledronic Acid (Reclast®, Aclasta®): A Review in Osteoporosis. Drugs. 2016 Nov;76(17):1683-1697. doi: 10.1007/s40265-016-0662-4. PMID: 27864686.

19. Peter B, Pioletti DP, Laïb S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli PY, Bouler JM, Gauthier O. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. Bone. 2005 Jan;36(1):52-60. doi: 10.1016/j.bone.2004.10.004.

20. Gao Y, Luo E, Hu J, Xue J, Zhu S, Li J. Effect of combined local treatment with ovariectomized rats. Bone. 2009 Feb;44(2):225-32. doi: 10.1016/j.bone.2008.10.054.

21. Stadelmann VA, Gauthier O, Terrier A, Bouler JM, Pioletti DP. Implants delivering bisphosphonate locally increase periprosthetic bone density in an osteoporotic sheep

- model. A pilot study. *Eur Cell Mater*. 2008 Jul 31;16:10-6. doi: 10.22203/ecm.v016a02.
22. Bobyn JD, McKenzie K, Karabasz D, Krygier JJ, Tanzer M. Locally delivered bisphosphonate for enhancement of bone formation and implant fixation. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Nov;91 Suppl 6:23-31. doi: 10.2106/JBJS.I.00518.
23. Li YF, Li XD, Bao CY, Chen QM, Zhang H, Hu J. Promotion of peri-implant bone healing by systemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporos Int*. 2013 Mar;24(3):1063-71. doi: 10.1007/s00198-012-2258-5.
24. Liu J, Pathak JL, Hu X, Jin Y, Wu Z, Al-Baadani MA, Wu S, Zhang H, Farkasdi S, Liu Y, Ma J, Wu G. Sustained release of zoledronic acid from mesoporous TiO₂-layered implant enhances implant osseointegration in osteoporotic condition. *J Biomed Nanotechnol*. 2018 Nov 1;14(11):1965-78. doi: 10.1166/jbn.2018.2635.
25. Korn P, Kramer I, Schlottig F, Tödtman N, Eckelt U, Bürki A, Ferguson SJ, Kautz A, Schnabelrauch M, Range U, Kneissel M, Stadlinger B. Systemic sclerostin antibody treatment increases osseointegration and biomechanical competence of zoledronic-acid-coated dental implants in a rat osteoporosis model. *Eur Cell Mater*. 2019 May 17;37:333-346. doi: 10.22203/eCM.v037a20.
26. Gao, Y., Zou, S., Liu, X., Bao, C., & Hu, J. (2009). The effect of surface immobilized bisphosphonates on the fixation of hydroxyapatite-coated titanium implants in ovariectomized rats. *Biomaterials*, 30(9), 1790–1796. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.025>.
27. Liu, J., Pathak, J. L., Hu, X., Jin, Y., Wu, Z., Al-Baadani, M. A., Wu, S., Zhang, H., Farkasdi, S., Liu, Y., Ma, J., & Wu, G. (2018). Sustained Release of Zoledronic Acid from Mesoporous TiO₂-Layered Implant Enhances Implant Osseointegration in Osteoporotic Condition. *Journal of biomedical nanotechnology*, 14(11), 1965–1978. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2635>
28. Li, Y. F., Li, X. D., Bao, C. Y., Chen, Q. M., Zhang, H., & Hu, J. (2013). Promotion of peri-implant bone healing by systemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 24(3), 1063–

1071. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2258-5>

29. Gao, Y., Luo, E., Hu, J., Xue, J., Zhu, S., & Li, J. (2009). Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone*, 44(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2008.10.054>

30. Long JA, Evans HM. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. *Mem. Univer. Calif.* 1922; 6:1-148.

31. Sayed AA, Soliman AM, Fahmy SR, Marzouk, M. Antiosteoporotic effect of *Coelatura aegyptiaca* shell powder on ovariectomized rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013;7(34):2406-2416. Doi: 10.5897/AJPP2013.3817

32. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro- computed tomography. *J Bone Miner Res*. 2010 Jul;25(7):1468-86. doi: 10.1002/jbmr.141.

33. Yogui, FC. Caracterização e avaliação randomizada de superfícies de liga de titânio modificada por hidroxiapatita e hidroxiapatita incorporada com estrôncio em ratas saudáveis e osteoporóticas. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araçatuba, São Paulo, 2020.

34. Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Aghaloo, T., Carlson, E. R., Ward, B. B., & Kademani, D. (2022). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons' Position Paper on Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws-2022 Update. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 80(5), 920–943. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2022.02.008>

35. Ferreira Jr, L. H., Jr, Mendonça Jr, K. D., Jr, Chaves de Souza, J., Soares Dos Reis, D. C., do Carmo Faleiros Veloso Guedes, C., de Souza Castro Filice, L., Bruzadelli Macedo, S., & Soares Rocha, F. (2021). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *Minerva dental and oral science*, 70(1), 49–57. <https://doi.org/10.23736/S2724-6329.20.04306-X>

36. MERHEB, J. et al. Influence of skeletal and local bone density on dental implant stability in patients with osteoporosis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*,

v. 18, n. 2, p. 253-260, 2016.

37. Gomes-Ferreira, P. H. S., Frigério, P. B., de Moura, J., Duarte, N. D., de Oliveira, D., Deering, J., Grandfield, K., & Okamoto, R. (2023). Evaluation of Vitamin D isolated or Associated with Teriparatide in Peri-Implant Bone Repair in Tibia of Orchiectomized Rats. *Biology*, 12(2), 228. <https://doi.org/10.3390/biology12020228>
38. Inoue, B. K. N., Paludetto, L. V., Monteiro, N. G., Batista, F. R. S., Kitagawa, I. L., da Silva, R. S., Antoniali, C., Lisboa Filho, P. N., & Okamoto, R. (2023). Synergic Action of Systemic Risedronate and Local Rutherpy in Peri-implantar Repair of Ovariectomized Rats: Biomechanical and Molecular Analysis. *International journal of molecular sciences*, 24(22), 16153. <https://doi.org/10.3390/ijms242216153>
39. Ramalho-Ferreira, G., Faverani, L. P., Momesso, G. A. C., Luvizuto, E. R., de Oliveira Puttini, I., & Okamoto, R. (2017). Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats. *Clinical oral investigations*, 21(5), 1485–1494. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1909-x>
40. Kitagawa, I. L., Miyazaki, C. M., Pitol-Palin, L., Okamoto, R., de Vasconcellos, L. M. R., Constantino, C. J. L., & Lisboa-Filho, P. N. (2021). Titanium-Based Alloy Surface Modification with TiO₂ and Poly(sodium 4-styrenesulfonate) Multilayers for Dental Implants. *ACS applied bio materials*, 4(4), 3055–3066. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01348>
41. Liu, R., Gao, Y., Huang, L., Shi, B., Yin, X., & Zou, S. (2023). Alpha-ketoglutarate up-regulates autophagic activity in peri-implant environment and enhances dental implant osseointegration in osteoporotic mice. *Journal of clinical periodontology*, 50(5), 671–683. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13784>

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº 0520-2022)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Sistemas de liberação inteligente de biomoléculas interferindo no reparo peri-implantar de ratas osteoporóticas**", Processo FOA nº 0520-2022, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Setembro de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 26 de Abril de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 26 de Maio de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Intelligent delivery systems of biomolecules interfering with the peri-implant repair of osteoporotic rats**", Protocol FOA nº 0520-2022, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on September 26, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 26, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 26, 2024.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B – Revista pretendida para submissão do artigo resultante do estudo

